

機関番号：12102

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591044

研究課題名(和文) メタボリックシンドローム治療に向けた脂質転写因子SREBP-1機能抑制効果の検討

研究課題名(英文) Investigation for suppressing function of the transcription factor SREBP-1, to develop therapeutic approach to Metabolic Syndrome.

研究代表者

高橋 昭光 (TAKAHASHI AKIMITSU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：70344893

研究成果の概要(和文)：

RNA 干渉による SREBP-1 の抑制は LDL 受容体欠損高脂質高カロリー食マウスの高トリグリセリド血症を著明に改善した。また野生型マウス由来腹腔マクロファージでは、SREBP-1a, -1c の双方のアイソフォームが発現しており、RNA 干渉で双方を抑制すると脂肪酸・コレステロール合成が抑制された。さらに LDL 受容体/SREBP-1 欠損マウスでは LDL 受容体欠損対照群に比べて動脈硬化形成が抑制され、SREBP-1 抑制がメタボリックシンドローム治療に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

The suppression of SREBP-1 resulted markedly improve the hypertriglyceridemia in the mice whose LDL receptor (LDLR) disrupted and which were fed high-fat-high-calorie diet. And in mouse-peritoneal macrophages, both of SREBP-1a and -1c isoforms were expressed and suppression of both isoforms by RNA interference caused less synthesis of fatty-acids or cholesterols. Furthermore, LDLR/SREBP-1 double knockout mice showed decrement in atherosclerotic lesion formation. Those findings suggest that SREBP-1 suppression could be a therapeutic strategy for metabolic syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：代謝学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：メタボリックシンドローム、転写因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 2005年に本邦におけるメタボリックシンドロームの診断基準が定められ、その結果、40歳以上の男性国民人口の約半数が腹囲基準に該当し、冠動脈疾患の高リスクであることから肥満症への介入手段の開発は急務であった。

(2) 従前より我々の研究室では SREBP-1 が脂肪合成や脂肪細胞分化から脂肪組織量を増加させ、インスリン抵抗性を惹起し、膵β細胞のインスリン分泌低下を来すことを解明し、メタボリックシンドロームの治療的介入の対象として SREBP-1 抑制は有望と考えられていた。

2. 研究の目的

野生型マウスモデル、LDL 受容体欠損マウス (LDLR^{-/-}) による動脈硬化モデルにおいて SREBP-1 を発現工学的手法やアデノウイルスベクターを用いた RNA 干渉法で発現を抑制し、メタボリックシンドロームの病態が改善するかを検討する。またマウス腹腔マクロファージの SREBP-1 も RNA 干渉で抑制し、泡沫化への影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) SREBP-1 ノックダウンアデノウイルスベクターの作成と SREBP-1 抑制効率の検討

従前より、本研究室で SREBP-1 ノックダウンベクター (Ad-SREBP-1i) を構築し検討中であったため、それをさらに HEK293 細胞を用いて増殖させた。対照 (LacZ RNA 干渉: Ad-LacZi) 群と Ad-SREBP-1i 群に分けた野生型 C57b16 マウスにそれぞれのウイルスベクターを感染させ、7 日後に抑制効率を検討した。SREBP-1 mRNA は定量 PCR 法で測定した。

(2) 野生型マウスにおける SREBP-1 RNA 干渉による検討

Ad-SREBP-1i を野生型 C57b16 マウスに感染させ、血清中のブドウ糖 (Glu)、インスリン (Ins)、コレステロール (Cho)、トリグリセリド (TG) について、測定キット (Wako) を用いて測定した。

(3) 食事性肥満モデルマウスにおける SREBP-1 RNA 干渉による検討

① 高脂肪高カロリー食により 2 週間飼育し肥満状態とした野生型 C57b16 マウスに上記ベクターを感染させ、血清中の Glu, Ins, Cho, TG, 並びに肝臓の TG, Cho 含量を測定した。

② 上記肝より RNA を抽出し、糖脂質代謝関連酵素の遺伝子発現をノザンブロットィングで検討した。

③ インスリン抵抗性の検討として、腹腔内投与によるインスリン負荷試験を行った。

(4) 高脂肪高カロリー食負荷 LDLR^{-/-}マウスによる高 TG, 高 Cho 血症に対する SREBP-1 RNA 干渉効果の検討

野生型マウスや SREBP-1^{-/-}マウス、肝 SREBP-1 強発現マウスは 3 ヶ月以上にわたる高カロリー高脂肪食負荷や食事性肥満のみでは大動脈弁輪部などに粥状硬化性プラークは殆ど生じないことが我々の予備検討では知られていた。そこで、これら食事性の負荷でマウスにおいても動脈硬化を形成しうる LDLR^{-/-} の遺伝子型にもつマウスに介入することでの動脈硬化への影響を検討することとした。そこで、LDLR^{-/-}マウスに Ad-SREBP-1i を感染させ、同時に高脂肪高カロリー食負荷を 7 日間行った後の血清 TG, Cho を検討した。

(5) 食事性肥満とした SREBP-1^{-/-}LDLR^{-/-}二重欠損マウスの検討

① LDLR^{-/-}マウスの SREBP-1 を長期的に抑制

して、動脈硬化への影響を検討するために SREBP-1^{-/-}LDLR^{-/-}二重欠損マウスを交配により作成した。これら二重欠損マウスについては、同胞 LDLR^{-/-}マウスを対照として、高脂肪高カロリー食負荷を 4 週間行い血清中の Glu, Ins, Cho, TG 測定ならびに耐糖能検査を検討した。

② 高脂肪高カロリー食負荷を 10 週間行った SREBP-1^{-/-}LDLR^{-/-}マウスと対照群について大動脈弁輪部の粥状硬化巣形成をオイル赤 o 染色で検出し、顕微鏡画像を画像処理ソフトウェア (ImageJ, NIH) を用いてそのプラークの断面積を測定した。

(6) 野生型マウス由来腹腔マクロファージ (MPM) における SREBP-1 RNA 干渉による検討

① チオグリコレート誘導 MPM に Ad-SREBP-1i と対照 Ad-LacZi を感染させ、定量 PCR 法で SREBP-1a, SREBP-1c の発現量を比較検討した。

② 脂質代謝関連遺伝子 (脂肪酸合成酵素 (FAS), HMG-CoA 還元酵素 (HMGCR), LDL 受容体 (LDLR), リポタンパクリパーゼ (LPL), スカベンジャー受容体 CD36 (CD36)) の発現について、mRNA 発現定量を行い SREBP-1 ノックダウンの影響を検討した。

③ Ad-SREBP-1i 感染後に ¹⁴C-酢酸 Na を加えた培地で MPM を培養後、脂質抽出を行い、薄層クロマトグラフィーで脂質分画を分離後、新規に合成されたステロールおよび遊離脂肪酸の放射線カウントを測定した。

4. 研究成果

(1) 作成した SREBP-1 ノックダウンアデノウイルスベクターはマウス肝の SREBP-1 遺伝子発現を抑制した。

今回作成した Ad-SREBP-1i は Ad-LacZi 対照群と比較し、SREBP-1 発現は 20% に抑制され、予備検討の再現性が得られ、有効な RNA 干渉が成立していることが確認された。

(2) SREBP-1 RNA 干渉マウスならびに SREBP-1^{-/-}マウスはいずれも野生型と比較して、血清トリグリセリドの低下を示した。

表 1. 野生型マウスの Ad-SREBP-1i 群と対照群の血中パラメータ

	対照	SREBP-1i	単位	p 値
Glu	119 ±5.96	129 ±6.08	mg/dl	0.232
Ins	53.0 ±23.2	71.9 ±44.6	pg/ml	0.718
Cho	85.2 ±7.22	65.6 ±5.18	mg/dl	0.0548
TG	101 ±7.63	76.0 ±7.36	mg/dl	0.0366*

いずれも血清中濃度。12時間空腹後採血の値。Welchのt検定、* p<0.05

Ad-SREBP-1iによるSREBP-1発現抑制では、血清TGの抑制が認められた。また、今回有意差は得られなかったが、ChoもSREBP-1発現抑制で低下傾向を示す可能性が示唆された。

(3)-① 食事性肥満モデルマウスにおいて、肝臓SREBP-1抑制は空腹時高血糖を改善した。

表2. 野生型食事性肥満モデルのAd-SREBP-1i群と対照群の血中パラメータ

	対照	SREBP-1i	単位	p値
Glu	273 ±58.5	151 ±23.7	mg/dl	0.0152*
Ins	3540 ±1360	4020 ±1680	pg/ml	0.831
Cho	238 ±22.1	208 ±55.9	mg/dl	0.644
TG	121 ±17.1	84.5 ±9.53	mg/dl	0.125

いずれも血清中濃度。高脂肪高カロリー食を2週間投与後、12時間空腹後採血の値。Welchのt検定、* p<0.05

食事性肥満を誘導したマウスのAd-SREBP-1iによるSREBP-1発現抑制では、有意な空腹時血糖改善が認められた。空腹時インスリン値は個体間差が大きい、インスリンには差がなく、インスリン抵抗性の改善を示している可能性があると考えられた。血清TGは若干、SREBP-1発現抑制により低下している可能性もあるが、通常食での検討とはことなり、有意な変化はみられなかった。

(3)-② 食事性肥満モデルマウスにおいて、肝臓SREBP-1抑制は下流の遺伝子発現を低下させると共に、糖新生を抑え、インスリンシグナルを増強をさせた。

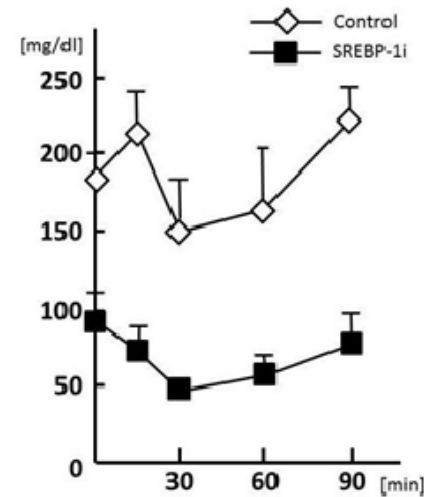
対照群と比較して、Ad-SREBP-1i群はSREBP-1発現が約10%まで低下していた。SREBP-1の下流にあたるFASは対照群の約25%、PPAR α も約25%に発現が低下し、脂肪酸合成の低下とそれに伴う脂肪酸代謝の低下が示唆された。一方、糖代謝関連遺伝子では、糖新生の鍵酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PEPCK)やG6Paseがそれぞれ対照群の50%、30%程度に抑制され糖新生がSREBP-1抑制により低下したと考えられた。解糖系の律速酵素であるグルコースキナーゼ(GK)はAd-SREBP-1i群では殆ど検出できないレベルに抑制。インスリンシグナルの中心的役割を担うIRS-2はRNA発現が対照群の

150%程度に発現上昇がみられた。

肥満時のSREBP-1はこれまでの我々の検討で、発現が更新しており脂肪蓄積機能やメタボリックシンドロームにおけるインスリンシグナル阻害を来すと考えられるが、今回の結果はSREBP-1を抑制することで、これらの、メタボリックシンドローム悪化要因が解除される可能性を示唆した。

(3)-③ 食事性肥満モデルマウスにおいて、肝臓SREBP-1抑制は個体レベルでインスリン抵抗性を改善した。

図1. 腹腔内投与インスリン負荷試験(0.3U/kg)



インスリン投与により、血糖はSREBP-1i群で明らかに低値を示し、SREBP-1抑制で食事性肥満に由来するインスリン抵抗性が改善したと考えられた。

(4) 高脂肪高カロリー食負荷LDLR^{-/-}マウスにおいて、肝臓SREBP-1抑制は、高TG血症を改善した。

表3. Ad-SREBP-1iによる高脂肪高カロリー食負荷後高脂血症の改善

	非感染	Control (LacZi)	SREBP-1i	p値
Cho	814 ±62.2	676 ±32.1	641 ±98.2	0.772
TG	527 ±46.5	256 ±29.5	140 ±18.4	0.0208*

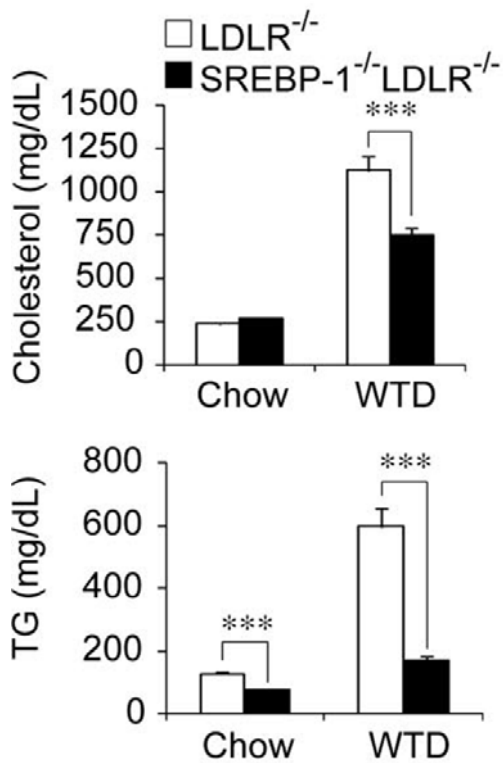
単位は[mg/dl]. Welchのt検定.*p<0.05

7日間の高脂肪高カロリー食負荷により、LDLR^{-/-}マウスの血清脂質レベルは著しく上昇した(Cho: 負荷前 195±26.9mg/dl→負荷後 814±62.2mg/dl, TG: 負荷前 130±21.2mg/dl→負荷後 527±46.5mg/dl)。

アデノウイルスベクター感染から7日間高脂肪高カロリー食負荷を行った場合、Ad-LacZi

対照群においてもアデノウイルスベクター非感染時よりも血清 Cho, TG は低下し、ことに TG は、Ad-LacZi 感染での低下が著しかった。Ad-SREBP-1i 感染群と対照群の比較においては、Cho は有意差を生じなかったが、TG は SREBP-1 抑制により高脂血症が改善した。(5)-① 高脂質高カロリー食負荷の SREBP-1^{-/-}LDLR^{-/-}マウスは対照群 LDLR^{-/-}マウスと比較して、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症の改善を認めた。

図 2. SREBP-1^{-/-}LDLR^{-/-}マウスの血清脂質



通常飼育食 (Chow) と高脂質高カロリー食 (Western diet; WTD) 4 週負荷後の血清脂質。***P<0.005 vs. control.

普通食摂取の SREBP-1^{-/-}LDLR^{-/-}二重欠損マウスは、SREBP-1 を欠損していない対照 LDLR^{-/-}群にくらべ血清 TG 濃度の低下は認められたが、Cho 濃度の低下は認められなかった。これは前述の高脂肪高カロリー食を短期負荷した LDLR^{-/-}マウスに対する Ad-SREBP-1i での遺伝子抑制介入の結果に類似すると考えられた。

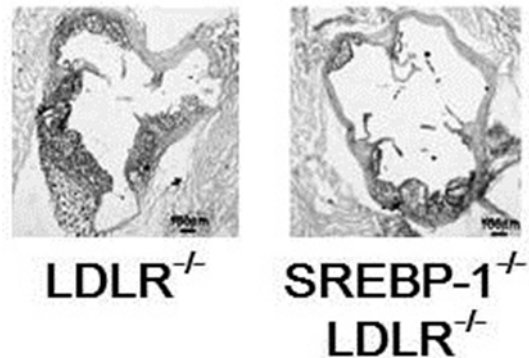
一方 SREBP-1^{-/-}LDLR^{-/-}二重欠損マウスに対する高脂質高カロリー食負荷の場合、SREBP-1 遺伝子が欠損することによって、血清 TG のみならず血清 Cho の有意な低下が認められた。さらに、LDLR^{-/-}マウスにおける高脂肪高カロリー食負荷の系に対する Ad-SREBP-1i での介入や、普通食での SREBP-1 欠損に比較すると、

SREBP-1 遺伝子の欠失による血清 TG の低下の程度は、前 2 者が対照群の 50%程度であったのに対し、食事負荷二重欠損マウスでは 30%以下と著明であった。これには Ad-SREBP-1i では 20%程度は SREBP-1 が残存し、過剰な食事栄養負荷時にはこの残存 SREBP-1 が高 Cho 血症や高 TG 血症のさらなる悪化に影響している可能性が示唆された。

なお、高脂肪高カロリー食負荷 SREBP-1^{-/-}LDLR^{-/-}マウスの空腹時血糖、空腹時インスリンについても測定したが、対照群との有意差は認められなかった。

(5)-② 高脂質高カロリー食負荷の SREBP-1^{-/-}LDLR^{-/-}マウスでは対照群 LDLR^{-/-}マウスと比較して、大動脈弁輪部の粥状プラーク形成が抑制された。

図 3. 高脂質高カロリー食負荷 SREBP-1^{-/-}LDLR^{-/-}マウスの粥状プラーク



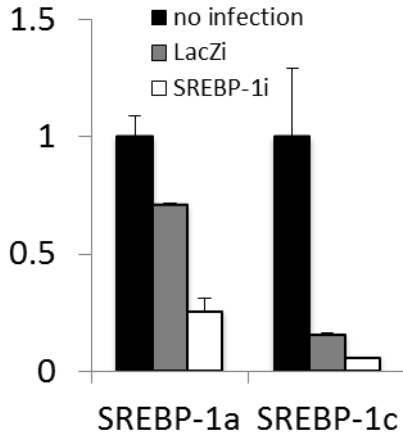
対照マウスの大動脈弁輪部凍結切片をオイル赤-O で脂肪染色。

高脂質高カロリー食負荷の LDLR^{-/-}対照群 (図 3 左) では、大動脈弁輪部の切片において、脂質が濃染された著明な粥状プラーク形成が観察された。一方、SREBP-1^{-/-}LDLR^{-/-}マウスでは対照群 LDLR^{-/-}マウスと比較して、大動脈弁輪部でオイル赤-O で染色される粥状プラーク形成が抑制されていた (図 3 右)。このことは、動脈硬化惹起性の高脂質高カロリー食負荷 LDLR^{-/-}マウスにおいて、SREBP-1 の存在が粥状硬化巣形成に重要な役割を持っているとともに、同遺伝子の機能を抑制することで粥状硬化巣形成を軽減しうる可能性があることが示唆された。なお、本検討は SREBP-1^{-/-}LDLR^{-/-}マウスの繁殖効率が低いことから、未だ各群 3~4 尾の少数において検討したため、今後さらに対象動物数を増やし、再現性を確認する必要があると考えられた。さらに、SREBP-1 欠損による動脈硬化抑制のメカニズムとしては、前述の高 TG 血症の是正のメカニズムを考察する必要があり、さらには、高 TG 血症の是正または SREBP-1 の直接的な機能によるリポタンパク性状の変化や、SREBP-1^{-/-}マクロファージの特性によ

る可能性、SREBP-1 の変化によるリポタンパクリパーゼ (LPL) 活性の変動などが考えられた。

(6)-① 野生型 MPM では SREBP-1a/ -1c のアイソフォームがともに発現しており、Ad-SREBP-1i は MPM の各 SREBP-1 アイソフォーム発現をそれぞれ 40% 以下に抑制した。

図 4. 野生型 MPM における SREBP-1 アイソフォームの発現と Ad-SREBP-1i の効果

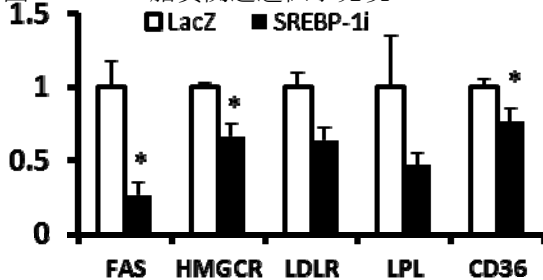


ベクター非感染群を 1 とした場合の Ad-LacZi 群、Ad-SREBP-1i 感染群それぞれの MPM で発現している SREBP-1 各アイソフォーム遺伝子の相対発現量。

野生型 MPM においては、SREBP-1a/ -1c 双方のアイソフォームが発現していることが確認された。通常、成体の肝臓や脂肪組織では SREBP-1c のみが発現しており、SREBP-1a の発現は殆どみられない。SREBP-1c が主として脂肪酸合成の促進、SREBP-1a は脂肪酸合成促進のみならずステロール合成促進をも活性化することから、マクロファージにおける SREBP-1a の発現は泡沫化などのメカニズムと関連している可能性が考えられた。また Ad-SREBP-1i の効果も検討し、SREBP-1 両アイソザイムはともに対象 Ad-LacZi 感染群の 40% 弱まで抑制された。

(6)-② 野生型 MPM での SREBP-1 抑制は、FAS, HMGCR, CD36 の発現を抑制し、LDLR や LPL も発現抑制傾向を示した。

図 5. MPM の脂質関連遺伝子発現



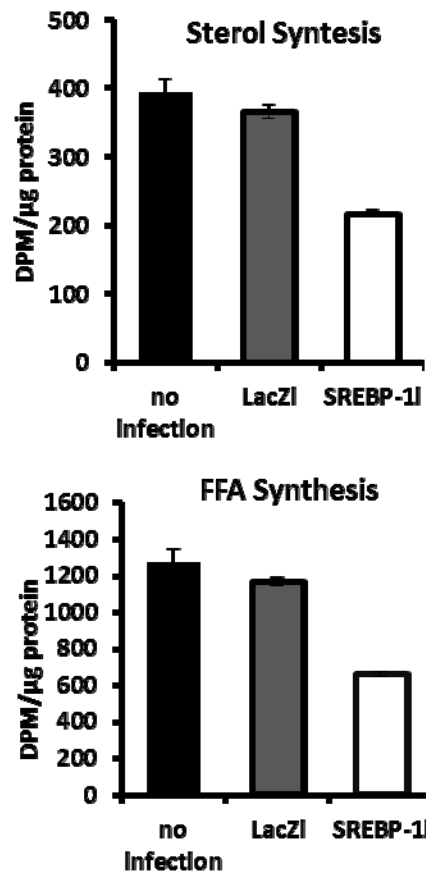
対照群 (LacZi) を 1 としたときの各脂質代謝

関連遺伝子の相対的発現量. *p<0.05

野生型 MPM が泡沫化する際に関連があると考えられる、脂肪酸合成およびコレステロール合成を担う FAS および HMGCR は Ad-SREBP-1i での SREBP-1 抑制で有意に発現が减弱した。これらは、コレステリルエステルを形成するにあたり双方重要と考えられる。マクロファージへのコレステロールの取り込みおよび脂肪酸の取り込みに関連があると考えられる LDLR, LPL は SREBP-1 抑制により発現の减弱傾向はみられたが有意差は生じなかった。同じく脂肪酸取り込みや変性 LDL 取り込みに関連する CD36 は、SREBP-1 抑制で有意な抑制を認めた。以上よりマクロファージにおける SREBP-1 発現抑制は内因性・外因性のステロール供給およびそれらをエステル化するのに必要な脂肪酸供給を抑制して、泡沫化を抑制する可能性が示唆された。

(6)-③ SREBP-1 発現抑制により、MPM の内因性新規脂肪酸合成、ステロール合成は抑制された。

図 6. MPM の内因性新規脂質合成と SREBP-1 発現抑制



MPM に対し、Ad-SREBP-1i での SREBP-1 抑制を行うと、内因性のステロール合成、脂肪酸合成が有意に抑制された。どちらの脂質もコ

レステルエステル形成のためには、等分子量必要であり、内因性の合成が抑制されるとコレステロールのエステル化が十分行い得ない場合が生じ、泡沫化メカニズムに関連すると考えられる。従って、Ad-SREBP-1i での SREBP-1 抑制はマクロファージの泡沫化抑制通じて動脈硬化予防の治療的なアプローチとなる可能性が示唆された。

以上、総括すると、SREBP-1 の抑制は、インスリン抵抗性の改善、血中 TG 濃度の低下を招き、動脈硬化の進展を抑制する可能性がある。さらに、マクロファージにおいても SREBP-1 の抑制で、内因性・外因性のステロール・脂肪酸の蓄積が抑えられ、泡沫化に対する介入となる可能性が示唆され、SREBP-1 抑制はメタボリックシンドロームの治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Karasawa T, Takahashi A, Saito R, Sekiya M, Igarashi M, Iwasaki H, Miyahara S, Koyasu S, Nakagawa Y, Ishii K, Matsuzaka T, Kobayashi K, Yahagi N, Takekoshi K, Sone H, Yatoh S, Suzuki H, Yamada N, Shimano H, Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1 Determines Plasma Remnant Lipoproteins and Accelerates Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 査読有 (印刷中)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 唐澤 直義, Systemic SREBP-1 deficiency improves atherosclerosis in LDLR^{-/-} mice, 第 42 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2010 年 7 月 16 日、長良川国際会議場 (岐阜)
- ② 唐澤 直義, 転写因子 SREBP-1 の動脈硬化性疾患に及ぼす影響の解析、第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会、2010 年 5 月 28 日、ラヴィール岡山 (岡山)
- ③ 唐澤 直義, Hepatic SREBP-1c activation accelerates atherosclerosis through altering plasma lipoprotein profile in LDLR knockout mice, 第 41 回日本動脈硬化学

会総会・学術集会、2009 年 7 月 18 日、海峡メッセ下関 (山口)

[その他]

ホームページ等

http://www.u-tsubukuba-endocrinology.jp/study/result/paper/article.html?data_id=5

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 昭光 (TAKAHASHI AKIMITSU)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師
研究者番号：70344893

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

島野 仁 (SHIMANO HITOSHI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号：20251241

矢藤 繁 (YATOH SHIGERU)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師
研究者番号：50451703

鈴木 浩明 (SUZUKI HIROAKI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授
研究者番号：40344890